

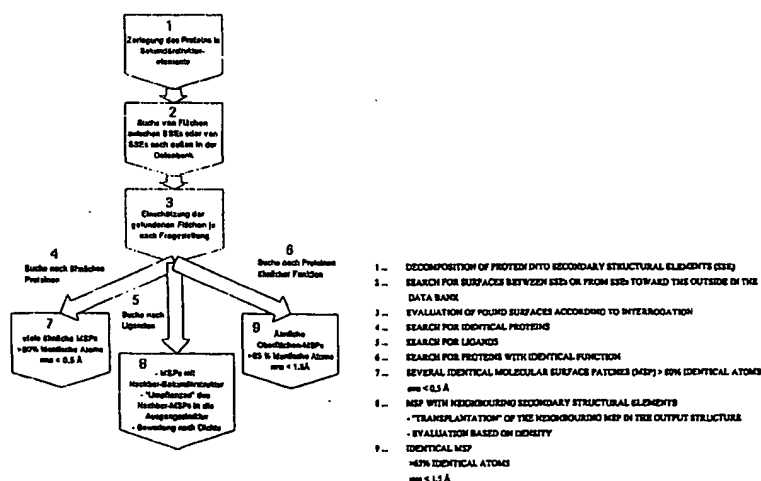
PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/53, C07K 1/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/04380 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Januar 2000 (27.01.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04951 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. Juli 1999 (13.07.99) (30) Prioritätsdaten: 198 31 758.1 15. Juli 1998 (15.07.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): JERINI BIO TOOLS GMBH [DE/DE]; Rudower Chaussee 5, D-12489 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRÖMMEL, Cornelius [DE/DE]; Maxim-Gorki-Strasse 17, D-15738 Zeuthen (DE). PREISSNER, Robert [DE/DE]; Stedinger Weg 13, D-10407 Berlin (DE). GOEDE, Andrian [DE/DE]; Barnimstrasse 35, D-10249 Berlin (DE). (74) Anwälte: PRÜFER, Lutz, H. usw.; Harthäuser Strasse 25d, D-81545 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>

(54) Title: DETERMINATION OF LIGANDS FOR PROTEINS

(54) Bezeichnung: LIGANDENBESTIMMUNG FÜR PROTEINE



(57) Abstract

The invention relates to a method for determining ligands for proteins. Said method comprises determining, by means of secondary structural elements of a given protein which form the binding site, molecular surface patches which are compared with known molecular surface patches with ligand.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Liganden für Proteine. Bei diesem Verfahren werden anhand der Sekundärstrukturelemente eines gegebenen Proteins, die den Bindungsstellen bilden, molekulare Oberflächenteile bestimmt, die mit bereits bekannten molekularen Oberflächenteilen mit Ligand verglichen werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Ligandenbestimmung für Proteine

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Liganden für Proteine gemäß den Merkmalen des Patentanspruches 1.

In der Biochemie versteht man unter Liganden biologische aktive Substanzen meist niedermolekularer Art, die durch Bindung an eine spezifische Bindungsstelle eines Makromoleküls eine bestimmte Wirkung auf das Makromolekül ausüben. Bei den hier betreffenden Makromolekülen kann es sich um Enzyme, Rezeptoren, DNA, RNA usw. handeln.

Durch Bindung des Liganden an das Makromolekül können beispielsweise der katalytische Umsatz eines Enzyms, die Aktivierung bzw. Inaktivierung eines Enzyms sowie Konformationsänderungen von Makromolekülen bewirkt werden.

In der pharmazeutischen Industrie werden bisher zwei Strategien zur Identifizierung biologischer aktiver Substanzen, d.h. Liganden, angewandt.

Die Unternehmen verfügen in der Regel über große Substanzsammlungen vieler verschiedener Einzelverbindungen. Diese Substanzen werden in biologischen Systemen, z.B. Zellassays, mittels Hochdurchsatzverfahren in Form von Pipettierstraßen mit automatischer Auswertung auf bestimmte Aktivitäten getestet. Treffer bei diesen Verfahren sind allerdings nur zufällig, sie treten aber mit bestimmten Wahrscheinlichkeiten auf.

Die Alternative dazu ist eine andere Strategie, die mit Hilfe von Computern durchgeführt wird. Unter Berechnung der Kräfte zwischen Molekülen werden am Computer Verbindungen, die an

bestimmte Proteinoberflächen binden sollen, virtuell erstellt und dann erst synthetisiert. So werden im Gegensatz zum obigen Verfahren weniger Substanzen synthetisiert und getestet. Es werden auch virtuelle Substanzbibliotheken von Molekülen, die nicht als Substanz vorliegen müssen, im Dockingverfahren am Computer auf eine Bindung an eine bestimmte Proteinoberfläche getestet. Wiederum werden dann nur die Treffer synthetisiert und in biologischen Testsystemen eingesetzt. Verfahren dieser Art sind bereits in den US-Patenten 5,495,423, 5,579,250 und 5,612,895 beschrieben worden.

In der Praxis wurden auch Kombinationen der oben beschriebenen Verfahren angewendet.

Bei diesen Verfahren wurden aber keine in der Natur vorkommenden Interaktionen ausgenutzt. Des weiteren sind viele bekannte Verfahren der Zufälligkeit ausgesetzt und müssen sich oftmals auf die virtuelle Beobachtung stützen. Dieses führt zu beträchtlichen Zeitverlusten und Ungenauigkeiten.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, bei dem die Liganden für Proteine schnell und zuverlässig bestimmt werden können.

Die Aufgabe wird mit einem Verfahren gemäß Patentanspruch 1 gelöst.

Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die Erfindung betrifft weiterhin Liganden, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung von Liganden für Proteine umfaßt folgende Schritte:

- a) Bestimmung derjenigen Sekundärstrukturelemente eines gegebenen Proteins, die den Bindungsort für den Liganden bilden. Insbesondere wird ein Oberflächenbereich des gegebenen Proteins bestimmt, der einen Bindungsort für einen vorherzusagenden Liganden bildet.
- b) Zerlegung der molekularen Oberfläche eines gegebenen Proteins in molekulare Oberflächenelemente. Insbesondere werden die Sekundärstrukturelemente eines Modelles des gegebenen Proteins anhand von Wasserstoffbrückenverbindungen definiert, wobei in Abhängigkeit des in a) bestimmten Oberflächenbereiches benachbarte Sekundärstrukturelemente zusätzlich zusammengefaßt und große Sekundärstrukturelemente, die über den Oberflächenbereich hinausragen, zusätzlich geteilt werden.
- c) Bestimmen von bekannten ähnlichen molekularen Oberflächenteilen zu denjenigen Oberflächenelementen, die den Bindungsort für den Liganden definieren, wobei die gefundenen molekularen Oberflächenteile ein komplementäres Nachbarelement besitzen. Insbesondere werden Atome eines jeden zu dem in a) definierten Oberflächenbereich gehörenden Sekundärstrukturelementes bestimmt, die einem umgebenden Lösungsmittel ausgesetzt sind. Dadurch werden Suchflächen definiert. Die Atombestimmung geschieht durch Abtasten der Oberfläche mit dem Modell eines Wassermoleküles auf einer Connolly-Oberfläche.

Dabei wird insbesondere eine Suchdatenbasis generiert, indem Paare miteinander in Kontakt tretender Flächen bestimmt werden anhand aller oder eines Teiles der Proteine oder Proteinkomplexe mit bekannter dreidimensionaler Struktur. Die Modelle der Proteine werden in Sekundärstrukturelemente und Teile der Sekundärstrukturelemente anhand der Wasserstoffbrücken zerlegt und die Atome eines Sekundärstrukturelementes, nämlich die Kontaktfläche, die mit einem anderen oder dem umgebenden Lösungsmittel in

Van der Waals-Abstand stehen, werden bestimmt.

Insbesondere werden ähnliche Flächen zu denjenigen Oberflächenelementen bestimmt, die den zu bestimmenden Bindungsort für den Liganden definieren, wobei die gefundenen molekularen Oberflächen ein komplementäres Nachbar-element besitzen. Dabei werden der Schwerpunkt und die Hauptausdehnung aller Suchflächen mit allen oder einem Teil der bestimmten Fläche überlagert. Die Überlagerung wird durch Maximierung der überlagerten Atome und Minimierung der quadratischen Fehlerabweichung optimiert.

- d) Koordinatentransformation des gefundenen ähnlichen molekularen Oberflächenteils mit Nachbarelement auf ein Ausgangselement bei einem rms-Wert unterhalb von 2Å. Insbesondere wird eine Koordinatentransformation der gefundenen Fläche in die Suchfläche für gegebene Protein durchgeführt.
- e) Beurteilung der Paßfähigkeit des Liganden gemäß lokaler Packungsdichte. Insbesondere wird die Überlagerung nach Anzahl der überlagerten Atome, nach Anzahl der überlagerten Atome gleicher Atomsorte und der quadratischen Fehlerabweichung durchgeführt. Ein Treffer kann anhand der lokalen Packungsdichte bewertet werden, die durch das Gegenüber der gefundenen Fläche und dem gegebenen Protein bestimmt ist.

Der Ablauf des erfindungsgemäßen Verfahrens wird anhand des in Fig. 1 gezeigten Fließdiagramms erläutert.

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere nach Schritt e) auf der Grundlage einer Datenbank durchgeführt. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die Datenbank "Dictionary of Interfaces in Proteins (DIP)" Journal of Molecular Biology, Bd. 280, S. 535ff, 1998, zu verwenden. Die Datenbank DIP stellt Flächen zwischen Sekundärstrukturen

(SSE) aller strukturell bekannten Proteine zur Verfügung. Diese Interfaces bestehen aus zwei Atommengen (Patches), die Teile von benachbarten Sekundärstrukturen sind und zusammen den Kontakt dieser beiden Strukturen ausmachen.

Bei der Bestimmung von Liganden, dem sogenannten "drug design", stellt sich die Frage, welche chemische Verbindung zu einer gegebenen Proteinstruktur paßt. Erfindungsgemäß werden die Sekundärstrukturelemente eines gegebenen Proteins, die den Bindungsort für den Liganden bilden, bestimmt. Dann wird die molekulare Oberfläche eines gegebenen Proteins zunächst in molekulare Oberflächenteile (MSP = molecular surface patches) zerlegt. Zu denjenigen Elementen, die potentiell die Bindungsregion definieren, werden beispielsweise aus der oben beschriebenen Datenbank ähnliche Flächen herausgesucht. Als Nebenbedingung wird bei dem Screening auf Ähnlichkeit verlangt, daß die gefundenen MSPs bereits ein komplementäres Nachbarelement besitzen. Eine Transformation, beispielsweise Koordinatentransformation, des gefundenen MSP mit Nachbarelement auf das Ausgangselement ist dann aussichtsreich, wenn der rms-Wert (mittlerer Fehler) unterhalb von 2Å liegt. Vorzugsweise liegt der Wert bei 1,5 Å. Für die Beurteilung der Paßfähigkeit des Liganden gegenüber dem Original hat sich die lokale Packungsdichte nach Goede et al., Journal of Computational Chemistry, Bd. 18, Nr. 9, S. 1114ff, 1997, bewährt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sollen die Außenflächen der Sekundärstrukturen bestimmt werden. Die Außenflächen, die den Kontakt herstellen, sind die MSP. Ähnliche molekulare Oberflächenteile werden überlagert. Nach der Koordinatentransformation liegen die gefundenen molekularen Oberflächenteile auf Atomen des Bindungsortes. Die besten potentiellen Liganden bilden die Leitverbindung. Der Vergleich der besten potentiellen Liganden mit einem bekannten Ausgangsprotein plus Ligand erfolgt als letztes.

Somit erfolgt erfindungsgemäß die Bestimmung eines komplementären Bindungspartners dadurch, daß ähnliche Elemente bestimmt werden, die bereits einen Bindungspartner besitzen.

Wenn die Liganden, bei denen es sich um Sekundärstrukturelemente aus ca. 10 Aminosäuren handelt, bestimmt sind, müssen sie für den Einsatz als Pharmakon noch optimiert werden, da Peptide aus den natürlichen L-Aminosäuren vielen Anforderungen nicht entsprechen.

Es gibt experimentelle Verfahren zur synthetischen Umwandlung von Peptiden in Peptidmimetika, z.B. Peptoide, die vom pharmakologischen Standpunkt aus betrachtet, häufig wesentlich günstigere Eigenschaften aufweisen. Die Verbindungen durchlaufen dabei in der Regel verschiedene Optimierungszyklen, in denen die Moleküle auch wirklich als Substanzen vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit, Leitverbindungen zu finden, besteht in der Suche in Datenbanken niedermolekularer Verbindungen. In diesem Falle werden die Koordinaten des entsprechenden passfähigen Peptids oder Teile davon verwendet, um in einer entsprechenden Datenbank nach dem angegebenen Überlagerungsverfahren (Vergleichsverfahren) zu suchen. Damit ist es möglich, völlig unabhängig von der peptidischen Grundstruktur Leitverbindungen zu finden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung von Liganden wird vorzugsweise für die aktiven Zentren von Enzymen beschrieben. Das Verfahren ist allerdings auch auf andere Makromoleküle (Proteine, DNA, RNA) übertragbar, sofern sie geeignete Oberflächen besitzen. Folgende Anwendungsgebiete kommen beispielsweise in Betracht:

- * Bindungs- und/oder Nachweismoleküle in diagnostischen Assays
- * Lebensmittelindustrie: Suche von Liganden für Geschmacksrezeptoren und Verwendung als Geschmackszusatzstoff

- * Biotechnologie: Moleküle für die Affinitätsreinigung
- * Proteine, die im therapeutischen Bereich gebunden werden müssen:
 - Enzyme, Rezeptoren, DNA, RNA
 - Zytokine oder Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, insbesondere diejenigen, die der Stoffwechselregulation dienen
 - Zelladhäsionsproteine und ihre Rezeptoren
 - Proteine der Signaltransduktionswege und ihre Bindungspartner
 - zytosolische Rezeptoren, Steroidrezeptoren
 - Proteine der Blutgerinnung
 - Neurotransmitter und ihre Rezeptoren
 - Proteine der Stoffwechselwege
 - Proteine der Replikation, Transkription und Translation
 - Proteine von Krankheitserregern (Bakterien, Viren, eukaryotische Einzeller, Parasiten)

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich auch zur Bestimmung von Proteinstrukturen anwenden. Es ist nicht auf alleinige Sequenzähnlichkeit angewiesen, sondern verwendet Strukturähnlichkeit von molekularen Grenzflächen von Sekundärstrukturelementen zur Vorhersage ihrer Wechselwirkungspartner. Dabei wird der Tatsache Rechnung getragen, daß gleiche (ähnliche) Grenzflächen auch bei unterschiedlichen Sequenzen entstehen können.

Beispielhaft soll im folgenden das Verfahren der Proteinstrukturbestimmung in seinen Schritten geschildert werden.

Im ersten Schritt wird eine gegebene Primärstruktur in ihrer vollen Länge in eine repetitive Sekundärstruktur "gewickelt". Dies bedeutet, daß mit Standard ϕ , φ und χ -Winkeln β -Faltblätter bzw. α -Helices über die volle Länge der Primärstruktur errechnet werden.

Im zweiten Schritt werden die entstandenen molekularen Grenzflächen dieser Sekundärstrukturelemente geclustert und mit einem artifiziellen neuronalen Netz bewertet, dessen Eingangsdaten sich aus den molekularen Oberflächen der geclusterten Strukturelemente ergeben. Die Bewertung erfolgt mit dem Ziel, einerseits zu bestätigen, ob überhaupt mit der gegebenen Primärstruktur molekulare Oberflächen bei dem Sekundärstrukturelement zu gestalten sind, die repräsentativ für das gegebene Strukturelement sind. Wenn nicht, wird die Sekundärstruktur verworfen. Damit ergibt sich ein neues Verfahren der Sekundärstrukturvorhersage. Das neuronale Netz wird anhand der bekannten Proteinstrukturen trainiert.

Alternativ zur allgemeinen Strukturbildung auf der Grundlage von Standard ϕ , ψ und χ -Winkeln für Helices bzw. Faltblättern können bekannte Sekundärstrukturvorhersagealgorithmen angewendet werden, so daß das vorgenannte Verfahren nur auf die vorhergesagten Strukturen (Teile der Sequenz) angewandt wird. In einem weiteren Schritt werden die gefundenen Clüster, die Kontakt zu einem bestimmten Sekundärstrukturelement (oder Solvent) haben, verwendet, um in der Datenbank DIP gleiche oder ähnliche molekulare Oberflächen und deren Nachbarn zu suchen. Dies geschieht mit dem weiter oben schon beschriebenen bias-freien Überlagerungsalgorithmus für atomare Sets.

Aus dem vorgenannten Arbeitsschritt ergeben sich eine Reihe von MPS, deren Partnerelement sicher bzw. weniger sicher (Variantenplanung) festliegt. Wird dabei "nicht-Solvent" vorhergesagt, versucht ein einfacher Docking-Algorithmus im dritten Schritt eine passende Fläche in anderen Sekundärstrukturelementen als dem direkt betrachteten zu lokalisieren. Der einfache Docking-Algorithmus beruht auf der Tatsache, daß molekulare Grenzflächenpartner zwischen Sekundärstrukturen innerhalb eines gegebenen Abstandes der beiden Schwerpunkte bzw. einem bestimmten Winkel der ausgezeichneten Richtung gesucht werden kann. Die Qualität der Paßfähigkeit wird mit Hilfe der molekularen Dichtebestimmung überprüft

(siehe oben, Goede et al.). Liegen die potentiellen Partner fest, wird in einem vierten Schritt die prinzipielle Faltbarkeit unter Einhaltung aller vorhergesagten Nachbarschaften (Solvent, Helix-Helix, Helix-coil, Helix-extended) überprüft und die allgemeine Faltung oder mehrere Varianten von der gegebenen Sequenz angenommen.

Das folgende Beispiel soll das erfindungsgemäße Verfahren erläutern.

Beispiel

Inhibitor-Design für das Proteasom

Ausgehend von einem Bindungsort einer aktiven Untereinheit des Proteasoms bei Hefe werden die Sekundärelemente bestimmt, die den Bindungsort bilden. Es stellt sich heraus, daß fünf Elemente beteiligt sind, wobei zwei größere Elemente den Bindungsort bestimmen. Anschließend werden die Außenflächen dieser Sekundärstrukturen bestimmt. Mit den Teilen der Außenflächen, die den Kontakt ausmachen und 12 bis 22 Atome umfassen, werden in der DIP-Datenbank ähnliche MSPs gesucht. Die ähnlichen MSPs von einer bestimmten Mindestgüte, wobei mindestens 70% der Atome überlagert sind und der rms-Wert 1,0Å beträgt, werden mit den Ausgangsflächen überlagert, wobei die Aminosäuren, die die Gegenseite der MSPs bilden bei der Koordinatentransformation der MSPs einbezogen werden. Nach der Koordinatentransformation liegen die gefundenen MSPs auf den Atomen des Bindungsortes, die Gegenseiten der MSPs in der Bindungstasche.

Die Gegenseiten der gefundenen MSPs, die die potentiellen Liganden darstellen, werden dahingehend überprüft, ob sie die Bindungstasche ausfüllen und ob die Abstände zu den Atomen der Bindungstasche groß genug sind. Dafür wird die lokale Dichte in der Bindungstasche berechnet. Die besten potentiellen Liganden bilden die Leitverbindungen.

Ein Vergleich der zehn besten potentiellen Liganden mit einer Proteasom-Struktur des Archaeobakteriums, die mit Ligand vorliegt, ergibt, daß die Hauptkette von einer der auf diese Weise berechneten Strukturen völlig identisch zu dem bekannten Inhibitor des Proteasoms des Archebakteriums ist.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung von Liganden für Proteine, das folgende Schritte umfaßt:
 - a) Bestimmen der Sekundärstrukturelemente eines gegebenen Proteins, die den Bindungsort für den Liganden bilden;
 - b) Zerlegung der molekularen Oberfläche des Proteins in molekulare Oberflächenelemente;
 - c) Bestimmen von ähnlichen Flächen zu denjenigen Oberflächenelementen, die die zu bestimmende Bindungsregion für den Liganden definieren, wobei die gefundenen molekularen Oberflächenteile ein komplementäres Nachbarelement besitzen;
 - d) Koordinatentransformation des gefundenen molekularen Oberflächenteils mit Nachbarelement auf ein Ausgangselement bei einem rms-Wert unterhalb von 2Å und
 - e) Beurteilung der Paßfähigkeit des Liganden gemäß lokaler Packungsdichte.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Außenflächen der Sekundärstrukturen bestimmt werden, wobei die Außenflächen, die den Kontakt herstellen, bevorzugt die molekularen Oberflächenteile sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die ähnlichen molekularen Oberflächenteile mit den Ausgangsflächen überlagert werden.
4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, bei dem nach der Koordinatentransformation die gefundenen molekularen Oberflächenteile auf Atomen des Bindungsortes liegen.
5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, bei dem die besten potentiellen Liganden die Leitverbindung bilden und/oder mit einem bekannten Ausgangsprotein plus Ligand verglichen werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Liganden in Form von Peptiden bestimmt werden, die bevorzugt etwa zehn Aminosäuren umfassen und bevorzugt anschließend in ein Peptidmimetikum umgewandelt wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei den die Proteine Enzyme sind.
8. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der rms-Wert 1,5Å beträgt.
9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Strukturbestimmung von Proteinen angewendet wird.
10. Verwendung eines nach den Ansprüchen 1 bis 12 hergestellten Ligands zur Herstellung eines Pharmakons.

1/1

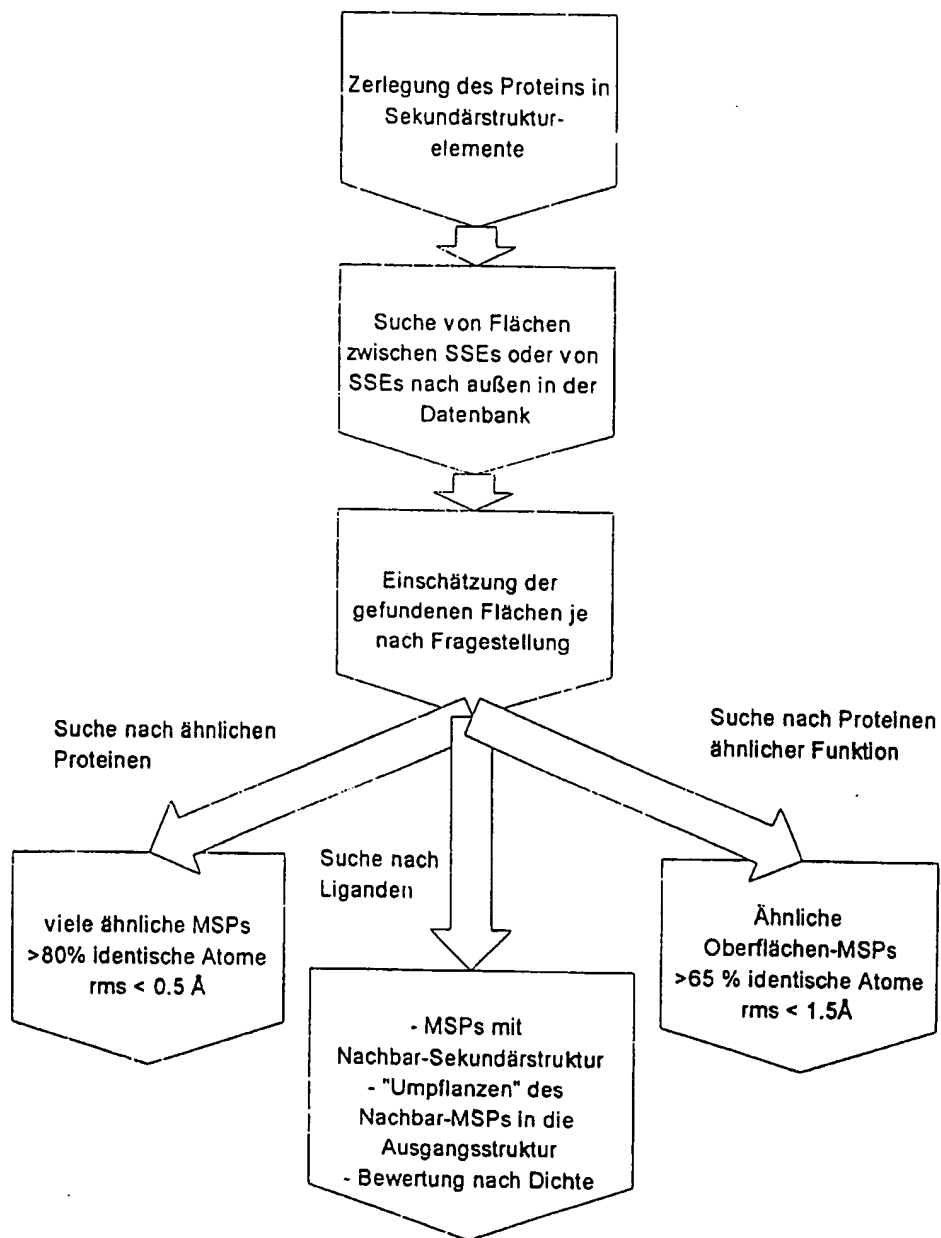


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/04951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/53 C07K1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N G06F C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 26277 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC ;UNIV BRANDEIS (US)) 24 July 1997 (1997-07-24) claims 10-21 page 5, line 11 - line 23 page 7, line 20 -page 8, line 9 page 17, line 3 - line 15 ---	1-10
X	WO 93 21206 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 28 October 1993 (1993-10-28) claims 7-14 page 4, line 11 -page 5, line 19 page 14, line 29 -page 15, line 4 page 17, line 1 - line 30 --- -/--	1-10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 1999

Date of mailing of the international search report

20/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/04951

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 01484 A (UNIV CALIFORNIA) 21 January 1993 (1993-01-21) claims 12-24 page 3, line 24 -page 4, line 27 page 19, line 1 -page 23, line 15 page 26, line 25 -page 27, line 18 ---	1-10
X	WO 91 16683 A (SCRIPPS CLINIC RES) 31 October 1991 (1991-10-31) claims 1-9 page 7, line 22 -page 8, line 6 ---	1-10
X	US 5 557 535 A (SRINIVASAN SUBHASHINI ET AL) 17 September 1996 (1996-09-17) claims ---	1-10
X	US 5 495 423 A (DELISI CHARLES ET AL) 27 February 1996 (1996-02-27) claims ---	1-10
X	PREISSNER R ET AL: "Inverse sequence similarity in proteins and its relation to the three-dimensional fold" FEBS LETTERS, (8 SEP 1997) VOL. 414, NO. 2, PP. 425-429. PUBLISHER: ELSEVIER SCIENCE BV, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS. ISSN: 0014-5793., XP002122575 CHARITE, INST BIOCHEM, MONBIJOUSTR 2A, D-10117 BERLIN, GERMANY (Reprint);CHARITE, INST BIOCHEM, D-10117 BERLIN, GERMANY the whole document ---	1-10
X	PREISSNER ET AL: "Dictionary of Interfaces in proteins (DIP)" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 280, no. 3, 1998, pages 535-550, XP000853728 cited in the application the whole document ---	1-10
X	GOEDE ET AL: "Voronoi cell: New method for allocation of space among atoms: Elimination of avoidable errors in calculation of atomic volume and density" JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY, vol. 18, no. 9, 1997, pages 1113-1123, XP000853716 cited in the application the whole document -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04951

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9726277	A	24-07-1997	AU 2244997	A	11-08-1997
			CA 2244228	A	24-07-1997
			EP 0876401	A	11-11-1998
WO 9321206	A	28-10-1993	AU 3971893	A	18-11-1993
			US 5807979	A	15-09-1998
WO 9301484	A	21-01-1993	AU 2408292	A	11-02-1993
			US 5436850	A	25-07-1995
WO 9116683	A	31-10-1991	AU 7883791	A	11-11-1991
			JP 5501324	T	11-03-1993
			PT 97480	A	31-05-1993
			US 5265030	A	23-11-1993
US 5557535	A	17-09-1996	US 5453937	A	26-09-1995
			US 5884230	A	16-03-1999
			AU 6779994	A	21-11-1994
			WO 9425860	A	10-11-1994
US 5495423	A	27-02-1996	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04951

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/53 C07K1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N G06F C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 26277 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC ;UNIV BRANDEIS (US)) 24. Juli 1997 (1997-07-24) Ansprüche 10-21 Seite 5, Zeile 11 - Zeile 23 Seite 7, Zeile 20 -Seite 8, Zeile 9 Seite 17, Zeile 3 - Zeile 15 ---	1-10
X	WO 93 21206 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 28. Oktober 1993 (1993-10-28) Ansprüche 7-14 Seite 4, Zeile 11 -Seite 5, Zeile 19 Seite 14, Zeile 29 -Seite 15, Zeile 4 Seite 17, Zeile 1 - Zeile 30 ---	1-10
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. November 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Routledge, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04951

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 01484 A (UNIV CALIFORNIA) 21. Januar 1993 (1993-01-21) Ansprüche 12-24 Seite 3, Zeile 24 -Seite 4, Zeile 27 Seite 19, Zeile 1 -Seite 23, Zeile 15 Seite 26, Zeile 25 -Seite 27, Zeile 18 ---	1-10
X	WO 91 16683 A (SCRIPPS CLINIC RES) 31. Oktober 1991 (1991-10-31) Ansprüche 1-9 Seite 7, Zeile 22 -Seite 8, Zeile 6 ---	1-10
X	US 5 557 535 A (SRINIVASAN SUBHASHINI ET AL) 17. September 1996 (1996-09-17) Ansprüche ---	1-10
X	US 5 495 423 A (DELISI CHARLES ET AL) 27. Februar 1996 (1996-02-27) Ansprüche ---	1-10
X	PREISSNER R ET AL: "Inverse sequence similarity in proteins and its relation to the three-dimensional fold" FEBS LETTERS, (8 SEP 1997) VOL. 414, NO. 2, PP. 425-429. PUBLISHER: ELSEVIER SCIENCE BV, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS. ISSN: 0014-5793., XP002122575 CHARITE, INST BIOCHEM, MONBIJOUSTR 2A, D-10117 BERLIN, GERMANY (Reprint);CHARITE, INST BIOCHEM, D-10117 BERLIN, GERMANY das ganze Dokument ---	1-10
X	PREISSNER ET AL: "Dictionary of Interfaces in proteins (DIP)" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 280, Nr. 3, 1998, Seiten 535-550, XP000853728 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-10
X	GOEDE ET AL: "Voronoi cell: New method for allocation of space among atoms: Elimination of avoidable errors in calculation of atomic volume and density" JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY, Bd. 18, Nr. 9, 1997, Seiten 1113-1123, XP000853716 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04951

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9726277 A	24-07-1997	AU 2244997 A CA 2244228 A EP 0876401 A	11-08-1997 24-07-1997 11-11-1998
WO 9321206 A	28-10-1993	AU 3971893 A US 5807979 A	18-11-1993 15-09-1998
WO 9301484 A	21-01-1993	AU 2408292 A US 5436850 A	11-02-1993 25-07-1995
WO 9116683 A	31-10-1991	AU 7883791 A JP 5501324 T PT 97480 A US 5265030 A	11-11-1991 11-03-1993 31-05-1993 23-11-1993
US 5557535 A	17-09-1996	US 5453937 A US 5884230 A AU 6779994 A WO 9425860 A	26-09-1995 16-03-1999 21-11-1994 10-11-1994
US 5495423 A	27-02-1996	KEINE	